

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## METHOD OF MEASURING CONCENTRATION OF MICROORGANISMS IN SUSPENSION

**Patent number:** SU1382848  
**Publication date:** 1988-03-23  
**Inventor:** OLENEV VYACHESLAV I (SU); MATYSYAK MARINA A (SU)  
**Applicant:** VNII BIOLOG PRIBOROSTROENIYA (SU)  
**Classification:**  
- **International:** C12Q1/00  
- **European:**  
**Application number:** SU19864114593 19860908  
**Priority number(s):** SU19864114593 19860908

Abstract not available for SU1382848



# **Technical Language Service**

Translations From And Into Any Language

## **RUSSIAN / ENGLISH TRANSLATION OF**

**Soviet Patent Application**

**SU 1,382,848 A1**

**Your Ref: 112202-10**

**For: Eastman Chemical Company**

Union of Soviet Socialist Republics

(19) **SU** (11) **1382848** **A1**

(51) 4 C 12 Q 1/00

State Committee of the USSR on  
Matters of Inventions and Discoveries

**INVENTION SPECIFICATION**  
**PERTAINING TO A CERTIFICATE OF AUTHORSHIP**

(21) 4114593/28-13

(22) 08.09.86

(46) 23.03.88, Bulletin No. 11

(71) All-Union Scientific Research Institute of Biological Instrument-Making

(72) V. I. Olenov and M. A. Matysyak

(53) 663.01 (088.8)

(56) Romanenko V. I. and Kuznetsov S. I. – Ecology of Freshwater Microorganisms, Leningrad,  
Nauka Publishers, 1094, pp. 115-116

**(57 Method for Determining Concentration of Microorganisms in a Suspension**

(57) The invention relates to microbiology and can be used in immunofluorescence analysis to determine the concentration of microorganisms. The objective of the invention is to increase the reliability of the method and to reduce the determination time. The method comprises adding a specific luminescent immunoglobulin to the cell suspension, introducing the resulting mixture to a gel, applying a microvolume of the mixture to a glass slide, holding the mixture to the beginning of polymerization, covering the mixture with a cover glass, and holding the mixture to hardening. The concentration of microorganisms is counted according to a formula given in the specification.

The invention pertains to microbiology and can be used in immunofluorescence analysis of microorganisms.

The objective of the invention is to increase the reliability of the method and to reduce the determination time.

The method comprises adding a specific luminescent immunoglobulin to a cell suspension, introducing the resulting mixture into a gel, applying a microvolume of the mixture to a glass slide, holding the mixture to the beginning of polymerization, covering the mixture with a cover glass, holding the mixture to hardening without the formation of cavities, and calculating the number of microorganisms (cells/mL) according to the formula

$$N = \frac{S_1 \cdot M \cdot a}{S_r \cdot 25 \cdot V_{pr}} \pm \varepsilon,$$

where  $S_1$  is the area of the cover glass, mm<sup>2</sup>;

$S_r$  is the area of the reticle referred to the magnification of the objective, mm<sup>2</sup>;

25 is the number of visual fields;

$M$  is the number of cells in 25 visual fields of each sample;

$V_{pr}$  is the microvolume of the mixture for one sample, mm;

$a$  is the number of the diluted suspension;

$\varepsilon$  is the error of the result from 10 samples.

**Example 1.** Determination of the concentration of *B. subtilis* cells in a daily broth culture

A daily *B. subtilis* culture grown in meat-peptone broth with a volume of 3 mL is placed in a cell (1 cm thick) of a spectrophotometer, and the density is measured at a wavelength of 600 nm, the value of which is more than 3 optical density units. The culture is diluted 20-fold with physiological saline (0.85% NaCl), and the optical density, which constitutes 0.36 optical density units, is measured. 0.375 mL of a luminescent immunoglobulin specific to *B. subtilis* diluted 1:8 is added to the resulting suspension. After the immunofluorescent reaction is run (15 minutes), 0.3 mL of deoxycholate is added to the resulting mixture (0.3 mL/mL), and the closed test tube is inverted several times without foaming. 0.3 mL of the resulting mixture is added to 2.7 mL of gel. Two drops of a mixture of 3 µL each are then applied to a degreased slide and, after 3 minutes of holding, each drop is covered with a cover glass that has a thickness of 0.15 mm [sic; mm] and measures 16 × 16 mm. The cells are counted under a microscope in 25 visual fields on five smears: 90.0, 89, 87, 100, and 82. The average number of cells (in 25 visual fields) is  $M = 91 \pm 3$ . The concentration of *B. subtilis* is as follows.

$$N = \frac{S_1 \cdot M \cdot a}{S_r \cdot 25 \cdot V_{pr}} \pm \varepsilon = (7.5 \pm 0.2) \times 10^9 \text{ cells/mL.}$$

Analysis time: 30-40 minutes.

**Example 2.** Calculation of *Escherichia coli* M17 cells in a Bifikol preparation

4.5 mL of undiluted Bifikol suspension containing *E. coli* M17 cells and bifidobacteria is combined with 0.6 mL of a luminescent immunoglobulin specific for *E. coli* in a dilution ratio of 1:8. After the immunofluorescence reaction has been conducted for 15 minutes, 0.45 mL deoxycholate (0.3 mg/mL) is added to the resulting mixture. The test tube (hermetically sealed) is inverted several times without foaming, and 4.2 mL of the resulting suspension is added to the polyacrylamide gel used in this case instead of distilled water. Two drops of 3  $\mu$ L each of the mixture are then applied to a degreased slide and, after 3 minutes of holding, each drop is covered with a cover glass (thickness: 0.15 mm), beneath which a vitrified sample that occupies a chamber measuring  $16 \times 16 \times 0.01103$  mm is formed after 7 minutes. The cells are counted under a microscope in 25 visual fields on six smears: 15, 20, 17, 16, 13, and 16. The average number of cells in 25 visual fields of the smears is  $M = 15 \pm 2$ . The concentration of *E. coli* M17 in the Bifikol preparation is as follows.

$$N = \frac{S_1 \cdot M \cdot a}{S_r \cdot 25 \cdot V_{pr}} \pm \varepsilon = (2.7 - 0.2) \times 10^7 \text{ cells/mL.}$$

Analysis time: 30-40 minutes.

The bifidobacteria cells do not interfere with the quantitative evaluation of the *E. coli* cells owing to specific staining of only the *E. coli* cells.

**Example 3.** Counting of total number of microorganisms in a Bifikol preparation with nonspecific staining of microorganism cells

4.5 mL of undiluted Bifikol suspension is mixed with 0.5 mL FIT (fluorescein isothiocyanate of example 1). The initial solution of FIT (1 mg/mL) at pH 8.0 is incubated for 10 minutes. 0.45 mL of deoxycholate (0.3 mg/mL) is added to the resulting mixture. 4.2 mL of the resulting suspension is added to the polyacrylamide gel used in this case instead of distilled water. Two drops of 3  $\mu$ L each of the mixture are then applied to a glass slide. After 3 minutes of holding, each drop is covered with a cover glass that has a thickness of 0.15 mm and measures  $16 \times 16$  mm. The cells are counted under a microscope in 25 visual fields on six [sic] smears: 86, 95, 87, 101, and 91. The average number of cells in 25 visual fields of the smears is  $M = 91 \pm 4$ .

$$N = \frac{S_1 \cdot M \cdot a}{S_r \cdot 25 \cdot V_{pr}} \pm \varepsilon = (1.02 - 0.04) \times 10^8 \text{ cells/mL.}$$

Analysis time: 30-40 minutes.

The employed gel must satisfy the following conditions: must not possess intrinsic luminescence during excitation in the wavelength range 400-500 nm, must not extinguish the luminescence of the dyes, must form a transparent vitreous body after polymerization, must not contain foreign inclusions, and must complete the formation of a vitrified body within 7 to 10 minutes.

These requirements are met, for example, by a polyacrylamide gel consisting of acrylic acid amide ( $\text{CH}_2\text{-CHCONH}_2$ ), ammonium persulfate ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), sodium dodecylsulfate SDS ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$ ), N,N'-methylenebisacrylamide ( $\text{CH}_2(\text{NHOCCH=CH}_2)_2$ ), N,N,N',N''-tetramethylethylenediamine ( $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), tris(hydroxymethyl)aminomethane ( $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ ), and tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride ( $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{HCl}$ ).

The following solution A is prepared for the process: 1.85 g tris-HCl, 7.7 g tris-OH, and 0.2 g SDS are dissolved in 25 mL distilled water, and the volume is made up to 50 mL following dissolution. Solution B: 14.6 g acrylamide and 0.4 g bis-acrylamide are dissolved in 50 mL distilled water; solution C: a ready-made solution of TEMED (N,N,N',N''-tetramethylethylenediamine); solution D: 200 mg ammonium persulfate is dissolved in 2 mL distilled water.

To prepare a gel, solutions A, B, C and D are mixed in the following order: 2.5 mL solution A, 3.3 mL solution B, the mixture is made up to 10 mL with distilled water, 5  $\mu\text{L}$  solution C, 50  $\mu\text{L}$  solution D.

The concentration of cells after total dilution  $P_\Sigma$  of the initial suspension

$$P_\Sigma = P_1 P_2 P_3 P_4,$$

(where  $P_1$  is the dilution of the initial suspension with phosphate buffer to  $D_{600} = 0.2\text{-}0.5$

$P_2$  is the dilution with luminescent immunoglobulin

$P_3$  is the dilution with deoxycholate

$P_4$  is the dilution with gel)

should amount to  $5 \cdot 10^6\text{-}10^8$  cells/mL.

The invention can be used in standardization of instruments intended for counting of cells in suspensions, concentrators, and instruments used to control environmental pollution at microbiological production facilities. Moreover, the method can be used to determine the

quantitative and qualitative compositions of cell suspensions in ready-made forms of vaccines and preparations.

### **Claims**

A method for determining the concentration of microorganisms in a suspension, comprising staining the suspension, diluting the product, fixing the cells in a medium, and applying the suspension to a slide with subsequent microscopic examination, characterized in that, in order to increase the reliability of the method and to reduce the determination time, the cell suspension is diluted to a concentration of  $10^6$ - $10^8$  cells/mL with a physiological saline containing 0.85% sodium chloride, a luminescence immunoglobulin specific for the given microorganism is added, the resulting mixture is incubated until the immunofluorescence reaction is completed, deoxycholate and a polymer gel are added thereto, and, prior to microscopic examination, the mixture applied to the slide is held to the beginning of polymerization, covered with a cover glass, and held to hardening.



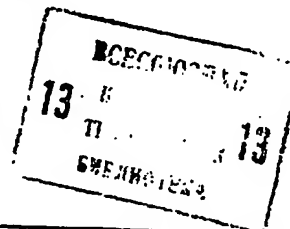
СОЮЗ СОВЕТСКИХ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ  
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1382848** **A1**

(51) 4 C 12 Q 1/00

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР  
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ



- (21) 4114593/28-13  
(22) 08.09.86  
(46) 23.03.88. Бюл. № 11  
(71) Всесоюзный научно-исследовательский институт биологического приборостроения  
(72) В.И. Оленев и М.А. Матысяк  
(53) 663.01(088.8)  
(56) Романенко В.И. и Кузнецов С.И. Экология микроорганизмов пресных водоемов. - Л.: Наука, 1974, с.115-116.  
(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ В СУСПЕНЗИЯХ  
(57) Изобретение относится к микробиологии и может быть использовано

при иммунофлуоресцентном анализе при определении концентрации микроорганизмов. Цель изобретения - повышение достоверности способа и сокращение времени определения. Способ заключается в добавлении к суспензии клеток специфического люминесцирующего иммуноглобулина, введении полученной смеси в гель, нанесении микрообъема смеси на предметное стекло, выдерживании ее до начала полимеризации, накрывании покровным стеклом и выдерживании до затвердевания. Концентрацию микроорганизмов подсчитывают по формуле, приведенной в описании изобретения.

(19) **SU** (11) **1382848** **A1**

Изобретение относится к микробиологии и может быть использовано при иммунофлуоресцентном анализе микроорганизмов.

Целью изобретения является повышение достоверности способа и сокращение времени определения.

Способ заключается в том, что в суспензию клеток добавляют специфический люминесцирующий иммуноглобулин, полученную смесь вводят в гель, микрообъем смеси наносят на предметное стекло, выдерживают до начала полимеризации, накрывают покровным стеклом и выдерживают до затвердевания без образования пустот и подсчитывают число микроорганизмов (кл/мл) по формуле

$$N = \frac{S_1 \cdot M \cdot a}{S_{ок} \cdot 25 \cdot V_{пр}} \pm \epsilon,$$

где  $S_1$  — площадь покровного стекла, мм<sup>2</sup>,

$S_{ок}$  — площадь окулярной сетки, приведенная к увеличению объектива, мм<sup>2</sup>;

25 — число полей зрения;

$M$  — число клеток в 25 полях зрения каждого образца;

$V_{пр}$  — микрообъем смеси для одного образца, мм;

$a$  — число разведенной суспензии;

$\epsilon$  — погрешность результата из 10 образцов.

Пример 1. Определение концентрации клеток *B. subfilis* в суточной бульонной культуре.

Суточную культуру *B. subfilis*, выращенную в мясопептонном бульоне, объемом 3 мл помещают в кювету (толщиной 1 см) спектрофотометра и измеряют плотность на длине волны 600 нм, величина которой составляет больше 3 ед. оптической плотности. Культуру разводят физиологическим раствором (0,85%-ным NaCl) в 20 раз и измеряют оптическую плотность, которая составляет 0,36 ед. оптической плотности. К 3 мл полученной суспензии добавляют 0,375 мл люминесцирующего иммуноглобулина, специфического к *B. subfilis* разведена 1:8. После проведения (15 мин) иммунофлуоресцентной реакции в полученную смесь добавляют 0,3 мл дезоксихолата (0,3 мг/мл), переворачивают закрытую пробирку несколько раз без образования пены.

0,3 мл полученной смеси добавляют к 2,7 мл геля. Затем на обезжиренное предметное стекло наносят по две капли смеси по 3 мкл, после 3 мин выдерживания каждую каплю накрывают покровным стеклом толщиной 0,15 мм размером 16x16 мм. Подсчет клеток проводят на микроскопе в 25 полях зрения на пяти мазках: 90, 0, 89, 87, 100, 82. Среднее число клеток составляет (в 25 полях зрения)  $M = 91 \pm 3$ . Концентрация *B. subfilis*

$$N = \frac{S_1 \cdot M \cdot a}{S_{ок} \cdot 25 \cdot V_{пр}} \pm \epsilon = (7,5 \pm 0,2) \times$$

$\times 10^9$  кл/мл.

Время анализа 30–40 мин.

Пример 2. Подсчет клеток кишечной палочки M17 в препарате Бификол.

4,5 мл неразведенной суспензии препарата Бификол, содержащего клетки кишечной палочки M17 и бифидобактерии, соединяют с 0,6 мл люминесцирующего иммуноглобулина, специфического к кишечной палочке разведения 1:8. После проведения иммунофлуоресцентной реакции 15 мин в полученную смесь добавляют 0,45 мл дезоксихолата (0,3 мг/мл), несколько раз (герметично закрытую) пробирку переворачивают без образования пены, 4,2 мл полученной суспензии добавляют в используемый в данном случае полиакриламидный гель вместо дистиллированной воды. Затем на обезжиренное стекло наносят 2 капли смеси по 3 мкл, после 3 мин выдерживания каждую каплю накрывают покровным стеклом толщиной 0,15 мм, под которым через 7 мин образовывается застеклованная проба, занимающая камеру размером 16x16x0,01103 мм. Подсчет клеток проводят на микроскопе в 25 полях зрения на шести мазках: 15, 20, 17, 16, 13, 16. Среднее число клеток в 25 полях зрения мазков  $M = 15 \pm 2$ . Концентрация кишечной палочки M17 в препарате Бификол

$$N = \frac{S_1 \cdot M \cdot a}{S_{ок} \cdot 25 \cdot V_{пр}} \pm \epsilon = (1,7 \pm 0,2) \times$$

$\times 10^7$  кл/мл.

Время анализа 30–40 мин.

Клетки бифидобактерий не мешают количественной оценке клеток кишечной палочки из-за специфического окрашивания только клеток кишечной палочки.

**Пример 3.** Подсчет общего числа микроорганизмов в препарате Бификол с помощью неспецифического окрашивания клеток микроорганизмов.

4,5 мл неразведенной суспензии препарата Бификол смешивают с 0,5 мл ФИТЦ (флуоресцеин изотиоцианат изомер 1). Исходный раствор ФИТЦ 1 мг-мл рН 8,0 инкубируют 10 мин. К полученной смеси добавляют 0,45 мл дезокси-холата (0,3 мг/мл). 4,2 полученной суспензии добавляют в используемый в данном случае полиакриламидный гель вместо дистиллированной воды. Затем на обезжиренное стекло наносят по 2 капли смеси по 3 мкл. После 3 мин выдерживания каждую каплю накрывают покровным стеклом толщиной 0,15 мм размером 16x16 мм. Подсчет клеток проводят на микроскопе в 25 полях зрения на шести мазках: 86, 95, 87, 101, 91. Среднее число клеток в 25 полях зрения мазков  $M =$

$$= 91 \pm 4. N = \frac{S \cdot M \cdot a}{S_{ок} \cdot 25 \cdot V_{пр}} \pm \epsilon = (1,02 \pm \pm 0,04) \cdot 10^8 \text{ кл/мл.}$$

Время анализа 30-40 мин.

Используемый гель должен удовлетворять следующим условиям: не обладать собственной люминесценцией при возбуждении в диапазоне длин волн 400-500 нм, не тушить люминесценцию красителя, образовывать после полимеризации прозрачное стекловидное тело, не должен содержать посторонних включений, образование застеклованного тела должно заканчиваться в течение 7-10 мин.

Таким требованиям отвечает, например, полиакриламидный гель, состоящий из акриловой кислоты амид ( $CH_2=CHCONH_2$ ), персульфата аммония  $(NH_4)_2S_2O_8$ , додецилсерной кислоты натриевая соль ДДС ( $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$ ),  $N, N'$ -метилен-бис-акриламида ( $CH_2(NHOCCH=CH_2)_2$ )  $N, N', N'', N'''$ -тетраметилэтилендиамина  $((CH_2)_2NCH_2CH_2N(CH_3)_2)_2$  трис-(оксиметил)-аминометана  $(NH_2C(CH_2OH)_3)$ , а также трис-(оксиметил)-аминометан гидрохлорида  $(NH_2C(CH_2OH)_3)HCl$ .

Для работы готовят раствор А: в 25 мл дистиллированной воды растворяют 1,85 г трис- $HCl$ , 7,7 г трис-ОН, 0,2 г ДДС, после растворения объем доводят до 50 мл; раствор В: в 50 мл дистиллированной воды растворяют 14,6 г акриламида, 0,4 г бис-акриламида; раствор С: готовый раствор ТЭМЭД ( $N, N', N'', N'''$ -тетраметилэтилендиамина); раствор D: в 2 мл дистиллированной воды растворяют 200 мг персульфата аммония.

Для приготовления геля смешивают растворы А, В, С, D в следующем порядке: 2,5 мл раствора А, 3,3 мл раствора В, доводят дистиллированной водой до 10 мл, 5 мкл раствора С, 50 мкл раствора D.

Концентрация клеток после суммарного разведения  $P_z$  исходной суспензии

$$P_z = P_1 P_2 P_3 P_4$$

где  $P_1$  - разведение исходной суспензии фосфатным буфером до  $D_{100} = 0,2-0,5$ ;

$P_2$  - разведение люминесцирующим иммуноглобулином;

$P_3$  - разведение дезоксихолатом;

$P_4$  - разведение гелем,

должна составлять  $5 \cdot 10^6, \dots 10^8$  кл/мл.

Изобретение может быть использовано при нормировании приборов, предназначенных для счета клеток в суспензиях, концентраторах, приборах, используемых для контроля загрязнений окружающей среды микробиологическими предприятиями. Кроме того, способ может быть использован для определения количественного и качественного составов клеточных суспензий в готовых формах вакцин и препаратов.

#### Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ определения концентрации микроорганизмов в суспензии, предусматривающий окрашивание ее, разбавление, фиксирование клеток к среде, нанесение суспензии на предметное стекло с последующим микроскопированием, отличающийся тем, что, с целью повышения достоверности способа и сокращения времени определения, суспензию клеток разбавляют физиологическим раствором, содержащим 0,85%-ный хлористый натрий, до концентрации  $10^6 - 10^8$  кл/мл, добавляют люминесцирующий иммуноглобулин, специфический к данному микроорганизму, и полученную смесь инкубируют до завершения иммунофлуоресцентной реакции, добавляют к ней дезоксихолат

и полимерный гель, а перед микроскопированием смесь, нанесенную на предметное стекло, выдерживают до нача-

ла полимеризации, накрывают покровным стеклом и выдерживают до затвердевания.

Редактор Н. Гунько

Составитель Л. Борисова  
Техред Л. Олейник

Корректор Н. Орлеин

Заказ 1263/22

Тираж 520

Подписное

ВНИИЦИ Государственного комитета СССР  
по делам изобретений и открытий  
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-полиграфическое предприятие, г. Ужгород, ул. Проектная, 4